Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. K. Botzenhart

VERSUCHE ZUR ERZIELUNG VON ANTIKÖRPERN GEGEN DAS HITZESTABILE HÄMOLYSIN VON PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät (Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Werner Löffler
aus Stuttgart

1984

Univ.
Leiden
Bibl.

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. K. Botzenhart

VERSUCHE ZUR ERZIELUNG VON ANTIKÖRPERN GEGEN DAS HITZESTABILE HÄMOLYSIN VON PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät (Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Werner Löffler
aus Stuttgart

1984

Dekan: Prof. Dr. med. G. Fichtner

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. K. Botzenhart
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Haberlandt

Dissertationsdruck Johannes Krause
7800 Freiburg, Werthmannplatz 2 (Universitätsbibliothek)

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	7
1.	Gewinnung von Glykolipid	7
2.	Darstellung der ß-OH-Dekansäure	7
2.1	Theoretische Vorbemerkung	7
2.2	Experimentelles Vorgehen	9
2.2.1	Darstellung der Ethyl-ß-OH-Dekansäure	9
2.2.2	Verseifung der Ethyl-ß-OH-Dekansäure	10
3.	Bakteriostatische Eigenschaften der ß-OH-Dekansäure	10
4.	Hämolytische Eigenschaften der ß-OH-Dekansäure	11
5.	Aufbereitung von Glykolipid zu Immunisierungsversuchen	12
6.	Aufbereitung der ß-OH-Dekansäure zu Immunisierungsversuchen	12
7.	Tierversuch - Immunisierungsschema	13
8.	Antikörpernachweis	14
8.1	Ouchterlony-Agardiffusionstest	14
8.2	Hämolyse- und Hämolysehemmtests	15
III.	Ergebnisse	16
1.	Darstellung und Eigenschaften der ß-OH-Dekansäure	16
1.1	Darstellung der ß-OH-Dekansäure	16
1.2	Bakteriostatische Eigenschaften der ß-OH-Dekansäure	17
1.3	Hämolytische Eigenschaften der ß-OH-Dekansäure	19
2.	Kontrolle der Inkorporation von Glykolipid in Liposomen	19
3.	Nachweis der Koppelung von ß-OH-Dekansäure an Rinderserumalbumin	21

		Seite
4.	Antikörpernachweis	24
4.1	Ouchterlony-Agardiffusionstest	24
4.2	Hämolysehemmtests mit Glykolipid	24
4.2.1	Hemmtest mit frischem Serum	25
4.2.2	Hemmtest mit komplementinaktiviertem Serum	25
4.3	Hämolysetests mit Glykolipid und Zusatz von Komplement	26
4.3.1	Hämolysetest mit komplementinaktiviertem Serum und Zusatz von Komplement	26
4.3.2	Hämolysetest mit der salzgefällten Ig-Fraktion von Serum K_2	27
4.3.3	Hämolysetest mit der isolierten Ig G - Fraktion von Serum K_2	27
4.3.4	Hämolysetest mit der Ig-Fraktion ohne Ig G von Serum K_2	28
4.4	Hämolysehemmtests und Hämolysetests mit ß-OH-Dekansäure	29
4.5	Zusammenstellung und Interpretation der Ergebnisse von 4.2 bis 4.4	29

IV. Diskussion 32

V. Zusammenfassung 35

VI. Literaturverzeichnis 36

Abkürzungen:

PA	Pseudomonas aeruginosa
GL	Glykolipid, das hitzestabile Hämolysin von PA
CF	Cystische Fibrose
CFA	Complete Freund's Adjuvant
RSA	Rinderserumalbumin
PBS	Phosphate buffered saline
ß-OH-DS	ß-OH-Dekansäure
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid
DMF	Dimethylformamid

I.Einleitung

Pseudomonas aeruginosa (PA), ein fakultativ anaerobes Stäbchenbakterium, stellt in der Gruppe der gram-negativen Bakterien mit seiner Pathogenität für Pflanzen, Insekten und Säugetiere eine Besonderheit dar. Im Verlauf der letzten Jahrzehnte wurde PA zu einem der wichtigsten Hospitalismuskeime. Im Vordergrund der Infektionsanfälligkeit für PA stehen drei Personengruppen - Patienten mit angeborenem oder erworbenem Immundefekt, Patienten mit Brandverletzungen und Patienten mit Cystischer Fibrose (19). Über die pathogenetische Wirkungsweise von PA herrscht Unklarheit(37).

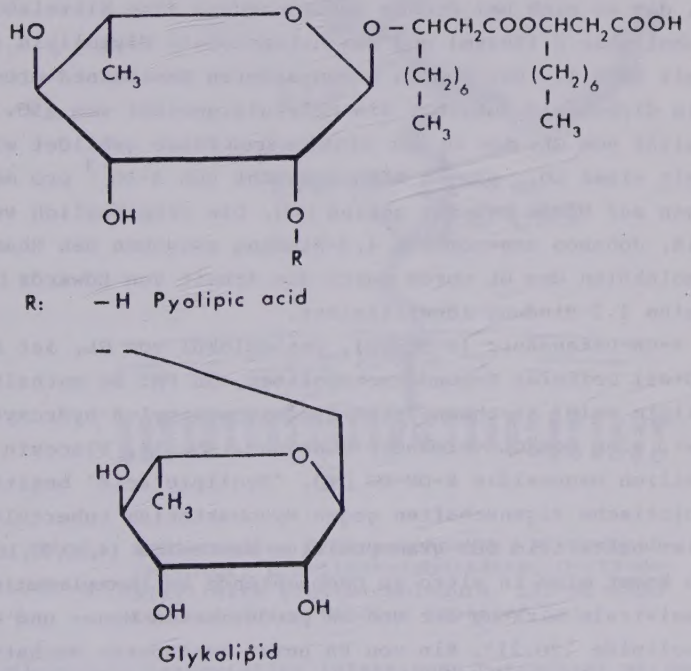


Abb.1 Pyolipic acid und Glykolipid (aus (28))

UNIV. BIBLIOTHEK

Im allgemeinen werden die verschiedenen Enzyme und Exotoxine des Bakteriums als krankheitsverursachend angesehen (2). Darüber hinaus ist PA in der Lage, andere pathogene Keime zu verdrängen. So tritt bei etwa 70% der an Cystischer Fibrose Erkrankten im Verlauf des chronischen Lungenprozesses PA an die Stelle einer Primärbesiedlung mit Streptokokken, Staphylokokken etc. In diesem Zusammenhang stehen die Produktion antibakterieller Substanzen durch PA (10) und eine wahrscheinliche Selektion durch die moderne Antibiotikatherapie, - auf die PA bekanntlich schlecht anspricht (28).

Die Produktion hämolytischer Substanzen durch PA war schon Anfang dieses Jahrhunderts bekannt (5). Die Arbeiten von u.a. Jarvis, Johnson, Kurioka (22,27) erbrachten den Nachweis, daß es sich bei diesen Substanzen um eine hitzelabile Phospholipase C (Enzym) und das hitzestabile Glykolipid (GL) handelt (Abb.1). Das von PA neben anderen Exotoxinen produzierte Glykolipid (GL) hat ein Molekulargewicht von 650. Die Toxizität von GL, das in der stationären Phase gebildet wird, ist mit einer LD_{50} pro kg Körpergewicht von $4 \cdot 10^{-3}$ pro mg GL bezogen auf Mäuse relativ gering (29). Die ursprünglich von Jarvis, Johnson angenommene 1,3-Bindung zwischen den Rhamnosemolekülen des GL wurde durch die Arbeit von Edwards (9) als eine 1,2-Bindung identifiziert.

ß-OH-Dekansäure (ß-OH-DS), Teilmolekül von GL, ist Bestandteil weiterer Sekundärmetaboliten von PA. So enthalten 'pyolipic acid' (L-rhamnosyl-ß-hydroxydecanoyl-ß-hydroxydecanoat, eine dem GL verwandte Substanz, Abb.1), Viscosin und vermutlich Magnesidin ß-OH-DS (28). 'Pyolipic acid' besitzt antibiotische Eigenschaften gegen Mycobakterium tuberculosis und ist bakterizid für gram-positive Bakterien (4,20,21,16). Hinzu kommt eine in vitro zu beobachtende antimycoplasmatische und anivirale Wirkung der von PA produzierten Mono- und Dirhamnolipide (20,21). Ein von PA unter besonderen Wachstumsbedingungen gebildetes, ß-Hydroxydekansäure und alpha-Dekensäure enthaltendes Rhamnolipid wird auf Grund seiner starken Emulgierungsfähigkeit in Öl-Wassersystemen auf seine Verwendungsmöglichkeit bezüglich einer Behandlung kohlenwasser-

stoffverschmutzten Wassers untersucht (49). Weiter ist ß-OH-DS in der Lipopolysaccharidschicht der äußeren Membran einiger gram-negativer Bakterien enthalten (36).

Sekundärmetaboliten, wie GL mit seinem Teilmolekül ß-OH-DS, sind auch hinsichtlich der neuerdings verstärkt in den Vordergrund tretenden Problematik bakterieller Adhaerenz von Interesse. Die Fähigkeit von Bakterien auf nahezu jeder beliebigen Oberfläche zu haften und zu wachsen, muß wohl als einer der wichtigsten, ersten Schritte in der

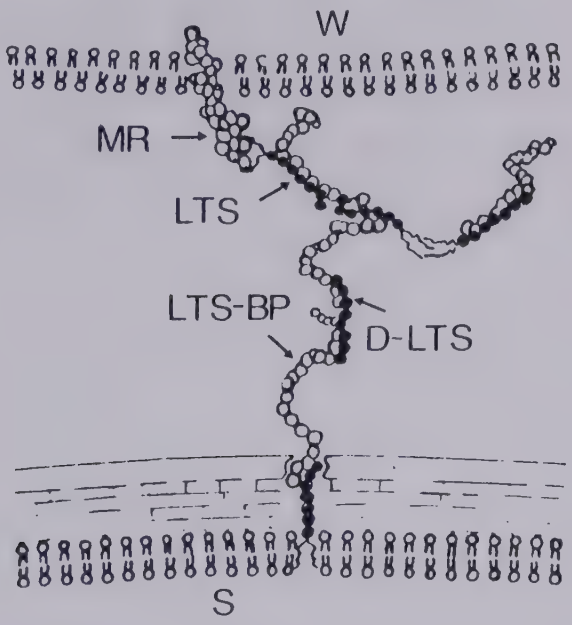


Abb.2 W=Wirtzelle, S=Streptokokkus, MR=Membranrezeptor, LTS=Lipoteicholsäure, D-LTS=dealkylierte Lipoteicholsäure, LTS-BP=Lipoteicholsäure-'Binding Protein' (3)

Pathogenese bakterieller Infektionen betrachtet werden (2, 12). Die Beteiligung von Lipoteicholsäure (LTS) an einem Adhäsin von Streptokokkus pyogenes (3) zeigt die Möglichkeit der Beteiligung von Nichtproteinen bei der Adhäsion

von PA (Abb.2). LTS besteht, qualitativ und quantitativ variierend, aus Phosphodiestern, Glycerin-, Alanin-, Glucose- und Fettsäureresten und hat amphiphile Eigenschaften (45, 1, 7). Für die Adhärenz von LTS an der Zellwand werden die Fettsäurereste, - vorwiegend Palmitinsäureester, verantwortlich gemacht (1).

Zu den Problemstellungen dieser Arbeit im einzelnen: - mit seiner zytolytischen Potenz stellt GL ein möglicherweise auch für den Menschen pathogenes Exotoxin von PA dar, das zu dem noch an der Adhäsion des PA-Bakteriums und bzw. oder dessen Invasivität beteiligt sein könnte. Damit zusammenhängend stellt sich die Frage nach einer Antikörperbildung gegen GL beim Säugetier. Mit einem Molekulargewicht von 650 ist GL immunologisch als Hapten zu klassifizieren. Eine Antikörperbildung gegen GL ist somit nur unter Annahme einer Liposomenbildung von GL im Körper oder einer Bindung an bakterielles oder körpereigenes Protein vorstellbar.

Für die Erzielung von Antikörpern gegen GL im Tierexperiment ergibt sich, daß GL als Hapten an Protein oder synthetische Träger mit hohem Molekulargewicht gebunden werden muß (25,6,35,30). Weitere Möglichkeiten sind Inkorporierung des Haptens in Liposomen (51,47), Emulsionen des Haptens in CFA (47,8) oder Asorption des Haptens an Erythrozyten (s.o.). Letztere Möglichkeit entfiel auf Grund der lytischen Potenz von GL und dem Fehlen geeigneter Untersuchungen über die Bindung von Haptenen an Erythrozytenfragmente. Vorversuche mit GL und Carbodiimiden zur Koppelung von GL an Proteine oder synthetische Träger ergaben eine starke Vernetzung der GL-Moleküle untereinander (teilweise feste Polymerisationsprodukte). Ein selektiver Schutz der OH-Gruppen der Rhamnosemoleküle zur Vermeidung dieser starken Vernetzung erscheint schwierig (u.a.48). In dieser Arbeit wurden deshalb die folgenden beiden Möglichkeiten vorgezogen - erstens die Emulsion von GL mit CFA (47,8) und zweitens die Inkorporation von GL in künstliche Liposomen aus Sphingomyelin, Cholesterol, Dicetylphosphat analog nach Weissman (42,43).

Werden Antikörper gegen GL gebildet, stellt sich die Frage, gegen welche Strukturen des Moleküls (besser Elektronenkonfiguration) diese gerichtet sind. Die Immunogenität von Zuckern ist bekannt. Die Arbeit von Kabat zeigt, daß selbst Isomaltose - in Liposomen eingebaut - immunogen sein kann (47). Über die Immunogenität reiner Lipide oder Fettsäuren ist nichts bekannt (25,6,35,30). Man nimmt an, daß, falls Antikörper gegen diese Substanzen gebildet werden, diese gegen die polaren Teilstrukturen gerichtet sind. So bleibt die Frage nach der Wirkung von Antikörpern gegen GL, wenn man annimmt, daß diese Antikörper nicht gegen die apolaren Teile der Fettsäure gerichtet sind, - aber gerade diese, wie wir annehmen (s.o.), wesentlich an einer Zytolyse beteiligt sind.

Mit der Beteiligung von ß-OH-DS an antibakteriell wirkenden Substanzen, Detergentien etc. stellt sich die Frage der Wirkung von ß-OH-DS auf andere Bakterien und die Frage nach einer im Tierexperiment erreichbaren Antikörperbildung gegen ß-OH-DS. Bei der Aufbereitung von ß-OH-DS zu Immunisierungsversuchen wurde von einem Einbau in Liposomen mit der Vorstellung, daß u.U. keine immunologisch erkennbaren Strukturen an der Liposomenoberfläche liegen, Abstand genommen (Abb.3). Der Koppelung an ein Trägerprotein und der Emulsion in CFA wurden der Vorzug gegeben. Bei der Koppelung von ß-OH-DS an Proteine muß die höhere Reaktionsbereitschaft der COOH-Gruppe im Vergleich zur ß-OH-Gruppe beachtet werden. Bei der Verwendung von Trägern scheint die Immunogenität des Trägers für die Bildung von Antikörpern gegen das Hapten notwendig zu sein, da bei der Verwendung isologer oder homologer Trägerproteine das Ausbleiben einer Immunantwort gegen das Hapten beschrieben wird (8,32,13,18). Weiter wird ein Einfluß des Trägers auf die Art der Immunantwort beobachtet (50,24). Eine Antikörperbildung vorausgesetzt, ist das Verhältnis Ig G / Ig M abhängig von der Anzahl von Haptenen pro Trägermolekül (26). Aus den genannten Gründen wurde Rinderserumalbumin (RSA) als Trägermolekül verwendet (Versuchs-

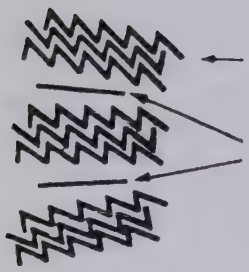


Abb.3 Vorstellung zu einer möglichen Nichtimmunogenität von ß-OH-DS bei einem Einbau in künstliche Liposomen

tier Kaninchen). Zur Vernetzung von Träger und Hapten bot sich aus chemischen Gründen - Carboxylgruppe der Fettsäure mit Bildung von Säureanhydrid (Abb.5) - die Carbodiimidmethode an (39,46). Das Verhältnis von Haptenmolekülen zu RSA-Molekülen wurde bei Reaktionsbeginn bei ca. 10:1 gehalten, wobei zu beachten ist, daß durch die zu der verwertbaren Anhydridbildung parallel laufende Uratbildung Haptenmoleküle der gewünschten Reaktion entzogen werden (Abb.5,6).

Abschließend ist zu erwähnen, daß ß-OH-DS chemisch dargestellt wurde, da bei der Gewinnung aus Bakterien oder der Abspaltung aus GL relativ geringe Mengen erhalten werden (22). Die Darstellung von ß-OH-DS erfolgte nach entsprechender Ausarbeitung eines von Frankenfeld (11) für ß-OH-Fettsäuren geringerer C-Atomzahl angegebenen Verfahrens.

II.Material und Methoden

1.Gewinnung von Glykolipid (GL)

Aus vielen in der Literatur für PA angegebenen Kulturmedien wurde ein synthetisches Flüssigmedium nach Kurioka ausgewählt (27).

Zusammensetzung:

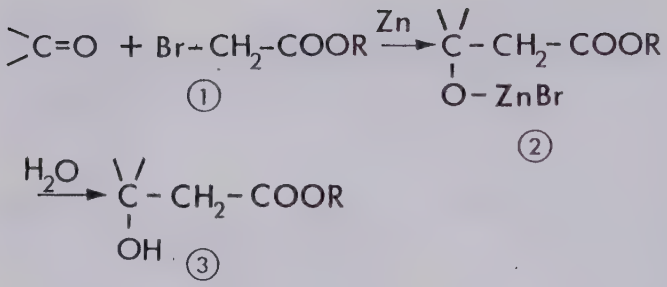
0,29% DL-Glutaminsäure	Zusatz:
0,13% DL-Alanin	3% eines folgendermaßen gewonnenen Dialysates: 74 g 'brain-heart infusion powder' (Difco) in 200 ml Wasser lösen, Suspension in 4 l aqua dest. bei 4°C 12 Stunden dialysieren, mit NaOH auf pH 7 einstellen
0,01% $CaCl_2$	
0,01% $MgSO_4$	
0,01% $ZnSO_4$	
0,61% Glucose	
0,43% NaCl	
+ Zusatz wie nebenstehend, sterilisieren	

Zu 250 ml Medium im 1 l Erlenmeyerkolben mit drei Schikanen wurde 1 ml einer 18 Stunden alten Bouillonkultur von PA 7 gegeben. Anschließend wurde bei 30°C für 36 Stunden im Schüttelbrutschrank bei 180 U/min inkubiert. Aus der Kulturflüssigkeit wurde GL nach Hauser gewonnen (15). Die Organismen wurden abzentrifugiert (18 000 x g, 15 Minuten, 4°C) und verworfen. Der Überstand wurde mit 10 N H_2SO_4 auf pH 2 eingestellt, 4 Tage bei 4°C aufbewahrt, danach die entstandenen Kristalle durch Zentrifugation abgeerntet ($18 \cdot 10^3$ x g, 30 Minuten, 4°C), zweimal mit Wasser gewaschen, die Suspension im Büchnertrichter mit Filterpapier Whatman Nr.1 und Unterdruck gefiltert und abschließend zweimal in Aceton/Wasser unter Zusatz von Aktivkohle umkristallisiert. Das so gewonnene GL ist eine weiße, kristalline Substanz, der Schmelzpunkt liegt bei 85°C.

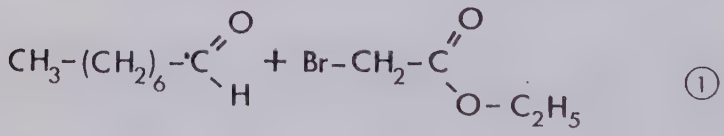
2.Darstellung der ß-OH-Dekansäure (ß-OH-DS)

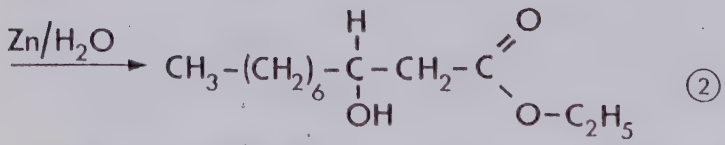
2.1 Theoretische Vorbemerkung

Bei der Reformatskij-Synthese werden alpha-Halogenester mit Aldehyden oder Ketonen in Gegenwart von metallischem Zink wie folgt umgesetzt (17):

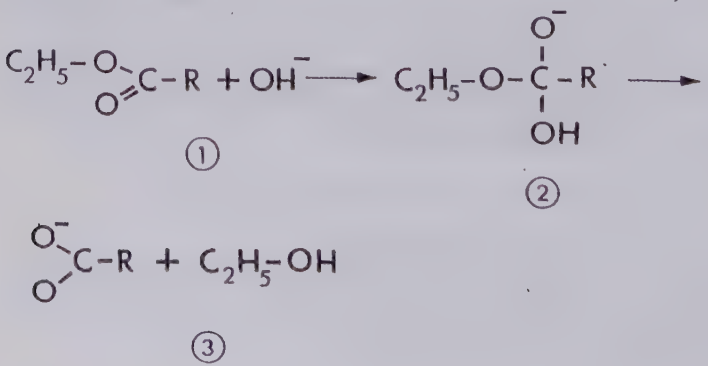


Um die benötigte Ethyl-ß-OH-Dekansäure zu erhalten, muß die Reaktion mit Octanal und Ethylbromacetat durchgeführt werden:





Die alkalische Verseifung der Ethyl-ß-OH-Dekansäure führt zur ß-OH-DS (40,45):



2.2 Experimentelles Vorgehen

2.2.1 Darstellung der Ethyl-ß-OH-Dekansäure

Zinkstaub wurde mit 20%-iger HCl aktiviert, mit Wasser, Aceton und wasserfreiem Äther in der genannten Reihenfolge gewaschen und anschließend unter Vakuum getrocknet. Im 1000 ml Vierhalskolben mit Rührer, Intensivkühler und Thermometer (Abb.4) wurden 35 g aktiviertes Zink mit 94 ml wasserfreiem Benzol stark gerührt (200 U/min) und bis zum Auftreten eines kräftigen Rückflusses am Kühler geheizt (Heizpilz 1 l). Bei einer Rührgeschwindigkeit von 50 U/min wur-

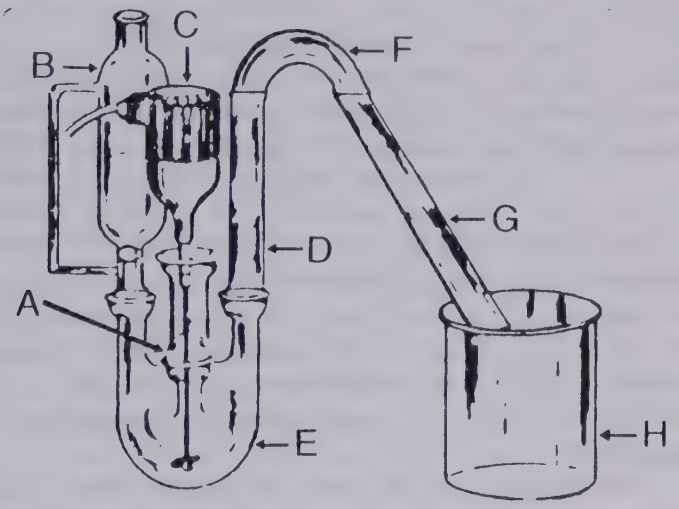


Abb.4 A = 1000 ml Vierhalskolben, B = Tropftrichter mit Druckausgleichsvorrichtung, C = elektrischer Rührer, D und G = Intensivkühler, E = Thermometer, F = Krümmer, H = Auffangbecherglas

de über den Tropftrichter ein Gemisch von 43,3 ml (0,389 mol) Ethylbromacetat und 42,6 ml (0,293 mol) Octanal (Merck, Darmstadt) langsam in den Vierhalskolben getropft. Die Temperatur wurde auf 80°C - 85°C gehalten. Die erforderliche Reaktionszeit war 70 Minuten. Das Reaktionsgemisch wurde

abgekühlt und unter schnellem Rühren tropfenweise 75 ml 50%-ige H_2SO_4 zugegeben. Die Temperatur wurde dabei im Acetonbad auf 6°C gehalten. Anschließend wurden die entstandenen Schichten im Scheidetrichter getrennt und die Benzolphase zweimal mit je 150 ml Wasser gewaschen.

Die organische Phase wurde in einer Vigreux-Destille in zwei Schritten destilliert. Dabei wurde das Benzol an der Wasserstrahlpumpe bei einer Temperatur von 35°C - 40°C abdestilliert, - der ölige, braune Rückstand wurde bei 0,24 Torr an der Ölpumpe weiterdestilliert. Im Temperaturbereich von 91°C - 94°C zeigte sich eine klare, ölige Flüssigkeit.

2.2.2 Verseifung der Ethyl-ß-OH-Dekansäure

15 g Ethyl-ß-OH-Dekansäure wurden mit 70 ml 1 N NaOH am Rückflußkühler bei 80°C vierzig Minuten lang erhitzt. Nach Verschwinden der Phasengrenze wurde die Lösung abgekühlt und im Scheidetrichter zweimal mit je 150 ml Äther gewaschen. Der Restester befindet sich in der Ätherphase, das Natriumsalz der ß-OH-DS in der wässrigen Phase. Die wässrige Phase wurde abgetrennt, 100 ml Essigester zugegeben und bei 4°C der pH, der sich erneut bildenden wässrigen Phase, mit HCl auf 2,5 eingestellt. Nach 30-minütigem Rühren wurde die Essigesterphase, - in der sich nun die freie Säure befindet, abgetrennt und mit aqua dest. gewaschen.

Die Essigesterphase wurde zum Wasserentzug im Rundkolben mit ausreichend Natriumsulfat (wasserfrei) 15 Minuten lang gerührt, die Flüssigkeit über einen Filter abgegossen und der Essigester am Rotationsverdampfer mit der Wasserstrahlpumpe bei ca. 48°C abgezogen. Der Rückstand ergab eine weißliche, feste Substanz, die zweimal in je 380 ml n-Hexan umkristallisiert wurde.

3.Bakteriostatische Eigenschaften der ß-OH-DS

Im Becherglas mit Magnetrührer (sterile Bedingungen) wurden zu 5 ml 0,01 M PBS 1 g ß-OH-DS gegeben, dann mit NaOH

und weiterer PBS ein Gesamtvolumen von 10 ml auf pH 7,2 eingestellt. Weiter wurde eine 1 : 2 Verdünnungsreihe von 0,1 g bis 0,00078 g ß-OH-DS/ml angefertigt und je 1 ml der entsprechenden Verdünnung zu 9 ml Tryptose-Soja Nährbouillon im Reagenzglas gegeben (d.h. 0,1 g bis 0,00078 g ß-OH-DS/10 ml). In die Reagenzgläser wurde jeweils eine Öse einer vierundzwanzig Stunden alten flüssigen Vorkultur von Staphylococcus aureus (ATCC 25232, 25237) bzw. Streptococcus pyogenes (zwei ß-hämolysierende Stämme der Gruppe A aus dem Routinebetrieb des Hygiene-Instituts der Universität Tübingen) eingebracht. Zur Kontrolle wurde entsprechend Nährbouillon mit PBS und NaOH, eingestellt auf pH 7,2, verwendet. Die Reagenzgläser wurden bei 37°C und 10 U/min im Schüttelbrutschrank gehalten. Beurteilt wurde die Trübung der Nährflüssigkeit und die nach 12, 24, 48 und 72 Stunden angefertigten Ausstriche auf Blutagarplatten. Die verwendeten Stämme wurden jeweils dreifach getestet.

4.Hämolytische Eigenschaften der ß-OH-Dekansäure (ß-OH-DS)

Gearbeitet wurde auf PVC-U-Mikrotiterplatten (Becton-Dikkinson, Heidelberg). Pro Näpfchen wurden 20 µl einer 10%-igen Hammelerythrozytensuspension in Veronalpuffer pH 7,2 verwendet. Weiter wurden pro Näpfchen 50 µl einer entsprechenden Verdünnungsstufe einer 12-stufigen 1:2 Verdünnungsreihe mit 10^{-1} g ß-OH-DS/ml bis $4{,}8 \cdot 10^{-5}$ g ß-OH-DS/ml zugegeben. Durch Zugabe von je 30 µl Veronalpuffer pH 7,2 wurde das Gesamtvolumen pro Näpfchen mit 100 µl konstant gehalten. Als Kontrolle wurde unter sonst gleichen Bedingungen auf pH 7,2 eingestellte NaOH (Konzentration entsprechend dem Maximum in der Verdünnungsreihe, s.3.), anstelle der Lösung mit ß-OH-DS, mitgeführt. Beurteilt wurde 100% Lyse der Erythrozyten nach einer Stunde (s.8.2). Für diesen Versuch gilt, daß er wie alle in dieser Arbeit vorkommenden Versuche auf Mikrotiterplatten, dreifach ausgeführt wurde.

5.Aufbereitung von Glykolipid (GL) zu Immunisierungsversuchen

GL wurde nach der Methode von Weissman in Liposomen inkorporiert (47,42,43). Zur Herstellung der Liposomen wurden Sphingomyelin, Cholesterol, Dicetylphosphat (Serva Feinbiochemica, Heidelberg) und GL im molaren Verhältnis von 2 : 1,5 : 0,2 : 0,2 verwendet. Für eine Injektion wurden so 10,52 µmol Sphingomyelin, 7,89 µmol Cholesterol, 1,05 µmol Dicetylphosphat und 1,05 µmol GL vorsichtig in 2 ml Chloroform gelöst und anschließend im 100 ml Rundkolben das Chloroform mit dem Rotationsverdampfer an der Wasserstrahlpumpe abgezogen. Dabei bildet sich ein milchiger Film am Gefäßboden. 1 ml 0,01 M PBS pH 7,2 und mehrere Glaskugeln (Durchmesser 2 mm) wurden zugegeben, die Mischung mit einem Vortex-Mixer suspendiert und die Emulsion für eine Quellphase von 2 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Abschließend wurde die Emulsion im Eisbad für drei Minuten mit Ultraschall von ca. 8 µm (Gerät Bransonic 221, Branson Ultraschall GmbH, Heusenstamm) resuspendiert.

6.Aufbereitung der ß-OH-Dekansäure (ß-OH-DS) zu Immunisierungsversuchen

ß-OH-DS wurde mit der Carbodiimidmethode an Rinderserumalbumin (RSA, Behringwerke AG, Marburg) gekoppelt (39,46,38). Bei der Reaktion von Carbodiimiden mit Carboxylgruppen ent-

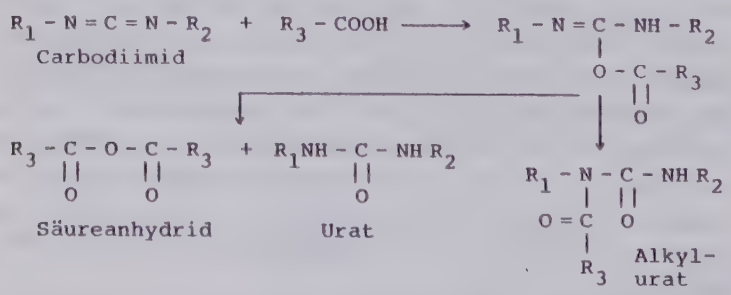


Abb.5 Reaktion von Carbodiimiden mit Carboxylgruppen

stehen das entsprechende Alkylurat, Säureanhydrid und disubstituiertes Urat (Abb.5). Das Säureanhydrid kann mit Proteinen unter Bildung einer Peptidbindung reagieren (Abb.6). Verwendet wurde 1-Ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimidhydrochlorid (EDC, Serva Feinbiochemica, Heidelberg),

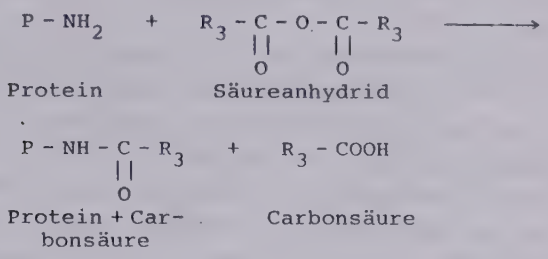


Abb.6 Reaktion von Säureanhydrid und Protein

dessen Uratderivate wasserlöslich sind (38). Bei dem für die Reaktion optimalen pH von unter 5,5 ist ß-OH-DS schlecht wasserlöslich. Daher wurde folgendermaßen vorgegangen: - im 10 ml Glasgefäß mit Magnetrührer wurden 340 µmol EDC in 0,4 ml H_2O vorgelegt, 25 µmol ß-OH-DS in 0,6 ml Dimethylformamid (DMF, Merck, Darmstadt) zugetropft und bei 4°C für zehn Minuten stark gerührt. Anschließend wurden 200 mg RSA in 2 ml H_2O unter schnellem Rühren zugetropft und bei 4°C für vier Stunden weitergerührt. Abschließend wurde für achtundvierzig Stunden gegen aqua dest. dialysiert.

7.Tierversuch - Immunisierungsschema

Verwendet wurden sechs männliche Kaninchen (K_1,...,K_6) von 3,5 kg bis 4 kg Gewicht.

Impfschema:

K_1 Liposomen mit GL, 1,0 ml (20,51 µmol Gesamtlipid) + CFA, 1 ml
K_2 Liposomen mit GL, 1,0 ml (20,51 µmol Gesamtlipid) + CFA, 1 ml
K_3 GL, 10 mg, in 0,5 ml 0,1 M PBS (mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt) + CFA, 1,5 ml

K_4 GL, 10 mg, in 0,5 ml 0,1 M PBS (mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt) + CFA, 1,5 ml
K_5 ß-OH-DS an RSA, 20 mg lyophilisierte Substanz gelöst in 0,5 ml 0,1 M PBS pH 7,2 + CFA, 1,5 ml
K_6 ß-OH-DS, 7 mg gelöst in 0,5 ml 0,1 M PBS pH 7,2 (mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt) + CFA, 1,5 ml

Die angegebenen Mengen beziehen sich auf jeweils eine Injektion

Die entsprechenden Substanzen, wie z.B. Liposomen, wurden unmittelbar vor der Injektion hergestellt. Die Injektionsflüssigkeit pro Injektion wurde auf vier subkutane Depots, rechts und links paravertebral, rechter und linker Hinterlauf, verteilt. Sechs Boosterinjektionen wurden im Abstand von 12 Tagen vorgenommen. 10 Tage nach der letzten Injektion wurde den Tieren aus der Ohrvene 20 ml Blut entnommen. Das Blut wurde bei 4°C zwölf Stunden aufbewahrt, dann bei 2500 U/min zentrifugiert und das Serum abpipettiert.

8.Antikörpernachweis

8.1 Ouchterlony-Agardiffusionstest

Verwendet wurden Agarschälchen von ca. 3,5 cm Durchmesser mit sechs peripheren und einem zentralen Stanzloch bei 2 ml 1%-iger Agarlösung (Difco, Detroit, USA) mit 0,9% Veronalpuffer pH 7,2 und 0,05% Natriumacid pro Schälchen (u. a.41). Getestet wurde einerseits mit GL und ß-OH-DS in Konzentrationen von je 0,1 g/ml, 0,05 g/ml und 0,025 g/ml bei einer Flüssigkeitsmenge von stets 20 µl pro Stanzloch. Serum wurde jeweils zentral aufgegeben. Andererseits wurden GL und ß-OH-DS mit einer 1,8-fachen Menge (bezüglich des Molekulargewichts, 30) an Lecithin (Fluka, Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm) gemischt, 2 ml Chloroform zugegeben, das Chloroform an der Wasserstrahlpumpe abgezogen und 1 ml Veronalpuffer pH 7,2 und mehrere Glaskugeln (Durchmesser 2 mm) zugegeben. Die Emulsion wurde mit einem Vortex-Mixer suspendiert und mit weiterem Veronalpuffer pH 7,2 Verdünnungen der oben angegebenen Konzentrationen bezogen auf GL bzw. ß-OH-DS hergestellt (dabei jeweilige Resus-

pension, über die Verwendung von 'auxilary lipids' u.a. 30, 34). Danach wurde vorgegangen wie oben beschrieben. Die Agarschälchen wurden in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur aufbewahrt. Der Beobachtungszeitraum war 6 Tage.

8.2 Hämolyse- und Hämolysehemmtests

Die Versuche wurden auf PVC-U-Mikrotiterplatten durchgeführt (Becton-Dickinson bzw. Falcon Plastics, Heidelberg). Eine 10%-ige Hammelerythrozytensuspension in Veronalpuffer pH 7,2 wurde stets in der gleichen Menge von 20 µl pro Näpfchen verwendet. Die Gesamtflüssigkeitsmenge pro Näpfchen wurde mit 145 µl konstant gehalten. Für Verdünnungsreihen und Flüssigkeitszusätze wurde Veronalpuffer pH 7,2 benützt. Die Reihenfolge Erythrozyten, GL oder ß-OH-DS, Veronalpuffer etc. bei der Eingabe in die Näpfchen wurde in allen Versuchen beibehalten. Serum wurde durch 30-minütiges Erwärmen auf 56°C komplementinaktiviert. Für Komplementzusätze wurden 25 µl Kaninchen- oder Meerschweinchenkomplement (lyophilisiert, Behringwerke, Marburg, gelöst in beiliegendem Lösungsmittel und in Veronalpuffer pH 7,2 so weiterverdünnt, daß in Proben keine Erythrozytenlyse auftrat, s.III.4.3.1) verwendet. Beurteilt wurde 100% Lyse der Erythrozyten nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C. Ausgegangen werden kann dabei von der hämolytischen Potenz von GL, wobei sich bei einer nicht zur vollständigen Hämolyse ausreichenden GL-Konzentration (wie auch bei entsprechenden Kontrollen) ein mehr oder weniger großes Erythrozyten-Pellet am Näpfchenboden zeigt.

III.Ergebnisse

1.Darstellung und Eigenschaften der ß-OH-Dekansäure (ß-OH-DS)

1.1 Darstellung der ß-OH-DS

Vom Destillat aus II.2.2.1 wurde ein H-NMR-Spektrum mit Standard Tetramethylsilan auf einem 60 Megahertz Varian CW-Spektrometer angefertigt (Abb.7). Die Integration über die Protonen zeigt, daß alle H-Atome vorhanden sind. Die Lage der Protonen im magnetischen Feld stimmt mit der Verbindung Ethyl-ß-OH-Dekansäure überein, die entsprechenden Zuordnungen wurden in der Abbildung getroffen (nach 33). Weiter zeigt das Spektrum (wie auch eine vorangegangene Gaschroma-

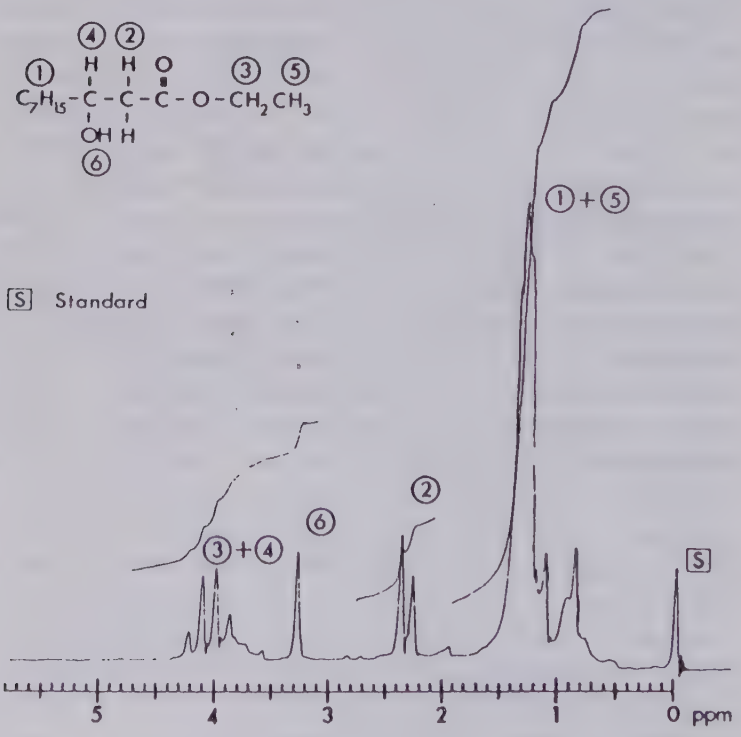


Abb.7 H-NMR-Spektrum von Ethyl-ß-OH-Dekansäure

tographie), daß das Destillat frei von Verunreinigungen ist.

Der mit 56,6°C bestimmte Schmelzpunkt der in II.2.2.2 durch Verseifung der Ethyl-ß-OH-Dekansäure gewonnenen weißlichen, festen Substanz ist identisch mit dem von Skogh (40) für ß-OH-DS angegebenen. Nach Durchführung einer Gaschromatographie, die zeigte, daß die Substanz frei von Verunreinigungen war, wurden ^{13}C-Kernresonanzspektren (Gerät WH 90 der Firma Brucker) von der Substanz angefertigt. Die Abbildung 8 zeigt ein ^{13}C-Kernresonanzspektrum der Meßfrequenz 22,628 Megahertz; die zehn Peaks zeigen die zehn C-Atome; die Lage der zehn C-Atome im magnetischen Feld beweist (mit der vorausgegangenen Verseifung und Schmelzpunktbestimmung), daß es sich bei der dargestellten Substanz um ß-OH-DS handelt (33). Somit konnte gezeigt werden, daß es mit dem von Frankenfeld (11) für ß-OH-Fettsäuren mit niedriger C-Atomzahl angegebenen Verfahren gelingt, auch ß-OH-Dekansäure darzustellen. Der Grad der Reinheit ist wesentlich abhängig von der Zahl der vorgenommenen Umkristallisierungen. (Anmerkung: da einzelne der in II.2.2.1 beschriebenen Reaktionsschritte exotherm und die verwendeten Chemikalien teilweise hochgiftig sind, ist auf Einhaltung entsprechender Schutzmaßnahmen zu achten)

1.2 Bakteriostatische Eigenschaften der ß-OH-DS

In Tryptose-Soja Nährbouillon wirkte ß-OH-DS auf Streptococcus pyogenes (zwei ß-hämolysierende Stämme der Gruppe A aus dem Routinebetrieb des Hygiene-Instituts der Universität Tübingen) bis zu einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^{-4}$ g/ml bakteriostatisch, auf Staphylococcus aureus (ATCC 25 232 und ATCC 25 237) bis zu einer Konzentration von $3,1 \cdot 10^{-3}$ g/ml, das heißt die beimpfte Nährflüssigkeit in den Reagenzgläsern blieb klar und die nach den angegebenen Zeiten (II. 3.) vorgenommenen Ausstriche auf Blutagarplatten zeigten im Gegensatz zu den Kontrollen keinerlei Bakterienwachstum.

Minimale Hemmkonzentration von ß-OH-DS	Streptococcus	Staphylococcus
	$1,5 \cdot 10^{-4}$ g/ml	$3,1 \cdot 10^{-3}$ g/ml

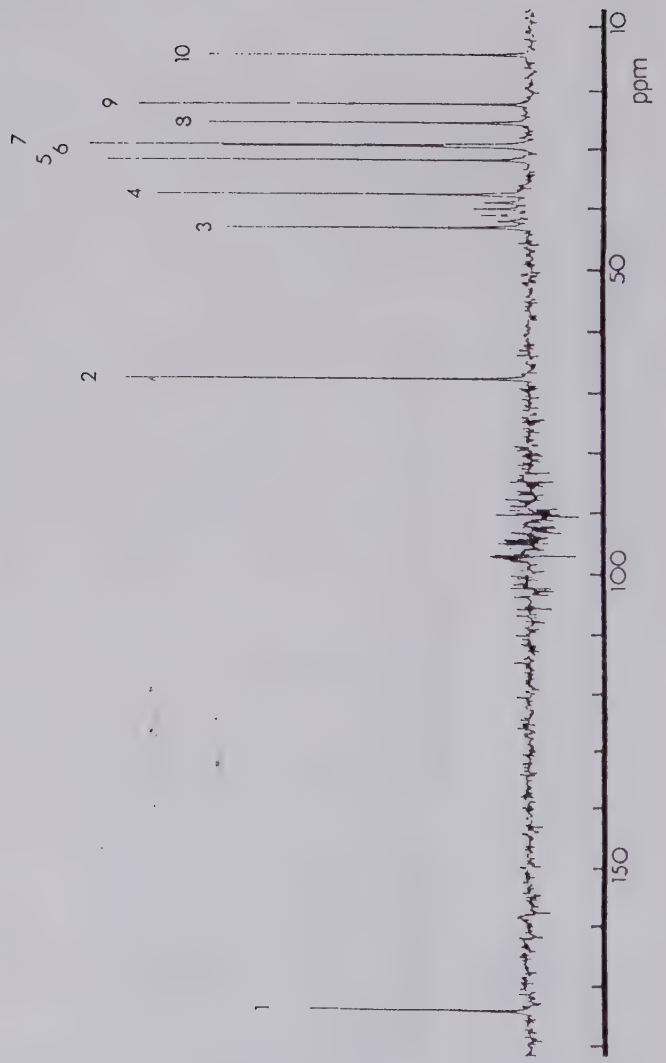


Abb.8 ^{13}C-Kernresonanzspektrum von ß-OH-DS, Meßfrequenz 22,628 Megahertz

1.3 Hämolytische Eigenschaften von ß-OH-DS

ß-OH-DS wirkt unter den in II.4. angegebenen Bedingungen auf Hammelerythrozyten bis zu einer Konzentration von $1{,}95 \cdot 10^{-3}$ g/ml bei einem Anteil von 20% einer 10%-igen Erythrozytensuspension 100% lytisch (Inkubationszeit 1 Stunde bei 37°C). Im Zusammenhang dieser Arbeit wesentlicher als diese durch äußere Einflüsse variierbare lytische Konzentration von ß-OH-DS ist die Relation der hämolytischen Potenz von ß-OH-DS und GL. GL lysiert Hammelerythrozyten unter denselben Bedingungen bis zu einer Konzentration von ca. $5 \cdot 10^{-3}$ g/ml. Bezogen auf die Molarität ergibt sich annähernd die Gleichheit der lytischen Konzentrationen von GL und ß-OH-DS (MG von ß-OH-DS 188), d.h. die Fettsäure kann als für die Lyse verantwortlich betrachtet werden.

2.Kontrolle der Inkorporation von Glykolipid (GL) in Liposomen

Zur Absicherung der Annahme einer Inkorporation von GL in die Liposomen (vergleiche II.5) wurden vergleichende Gelchromatographien mit Liposomen ohne GL, reinem GL (vorbehandelt wie bei der Liposomenherstellung), Liposomen mit GL und Dextranblau an Sephacryl 6 B (Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg) mit 0,01 M PBS pH 7,2 als Laufmittel vorgenommen (Abb.9). Bei einer Säulenlänge von 20 cm und einem Säulendurchmesser von 1,5 cm war das Totalvolumen 35,3 ml, das mit Dextranblau (MG $2 \cdot 10^6$) ermittelte Ausschlußvolumen lag bei ca. 13 ml (Uvicord S, Microperpex Peristaltic Pump, Multirac 2111 von LKB Instrumente GmbH, Gräfelfing). Bei den für die Herstellung der Liposomen verwendeten Substanzen sind, außer beim GL, keine Zucker am Molekülaufbau beteiligt. Ein qualitativer GL-Nachweis konnte daher mit Orcin-Eisen-III-chlorid/Schwefelsäure (Reagenz Nr.250,zuckerspezifisch, der Firma Merck, Darmstadt) erfolgen. Die Abb. 9 a) zeigt die annähernde Gleichheit des Molekulargewichts der Liposomen mit dem von Dextranblau. Der Zuckernachweis ist beim Lauf der Liposomen ohne GL negativ, beim Lauf von reinem GL positiv. Die Liposomenfraktion und die GL-Frak-

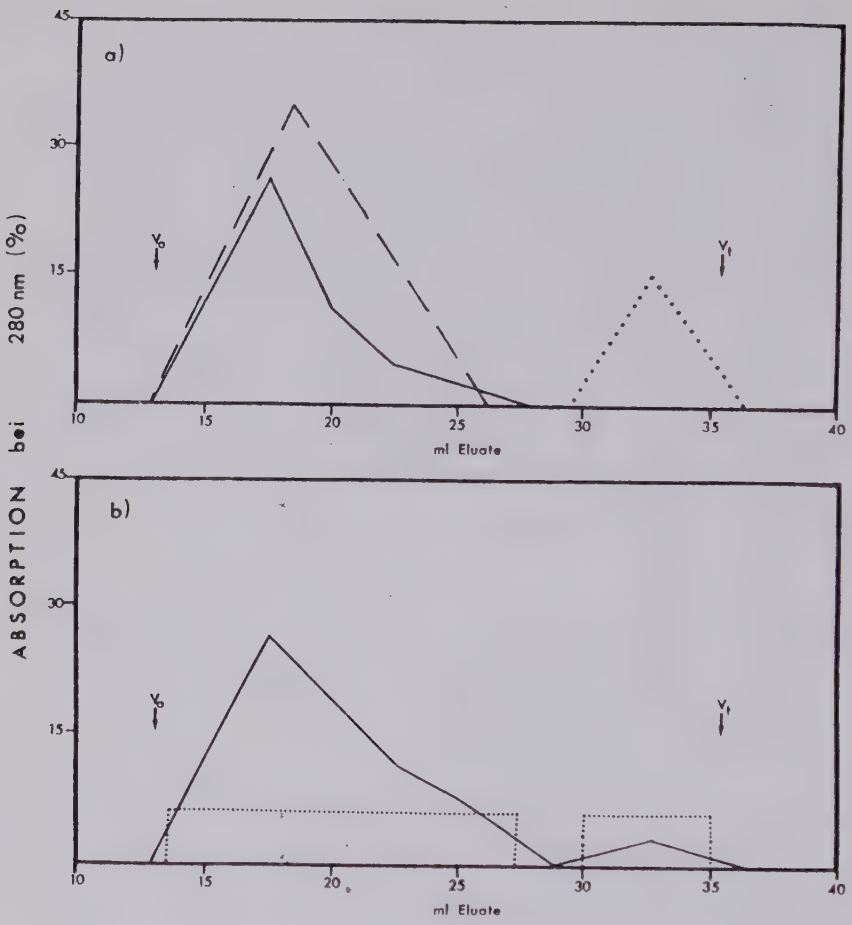


Abb.9 Gelchromatographie an Sephacryl 6 B

a) — — — Dextranblau

..... GL

——— Liposomen ohne GL

b) ——— Liposomen mit GL

:.....: Zuckernachweis positiv

tion sind, bedingt durch die verschiedenen 'Molekulargewichte', getrennt, d.h. das Gelfiltrat zeigt, daß GL in Monomeren oder Liposomen mit geringem Molekulargewicht (verglichen mit den Liposomen aus Sphingomyelin, Cholesterol, Dicetylphosphat) vorliegt. Wie die Abb.9 b) zeigt, ist der Zucker- und damit GL-Nachweis bei Liposomen mit GL nach einem Durchlaufvolumen von ca. 13,5 ml positiv, das heißt es kann davon ausgegangen werden, daß GL in Liposomen aus Sphingomyelin, Cholesterol und Dicetylphosphat mit einem Molekulargewicht von ca. $2 \cdot 10^6$ inkorporiert wurde.

3. Nachweis der Koppelung von ß-OH-Dekansäure (ß-OH-DS) an Rinderserumalbumin (RSA)

Zum Nachweis der Koppelung wurde das Dialysat aus II.6. an Sephadex G 200 (Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg) mit einer Säule von Länge 50 cm, Durchmesser 1,5 cm, Laufmittel 0,1 M Tris/HCl-Puffer pH 7,2 gelchromatographiert (Abb.10, Uvicord S, Microperpex Peristaltic Pump, Multirac 2111 von LKB Instrumente GmbH, Gräfelfing). Von den einzelnen Fraktionen

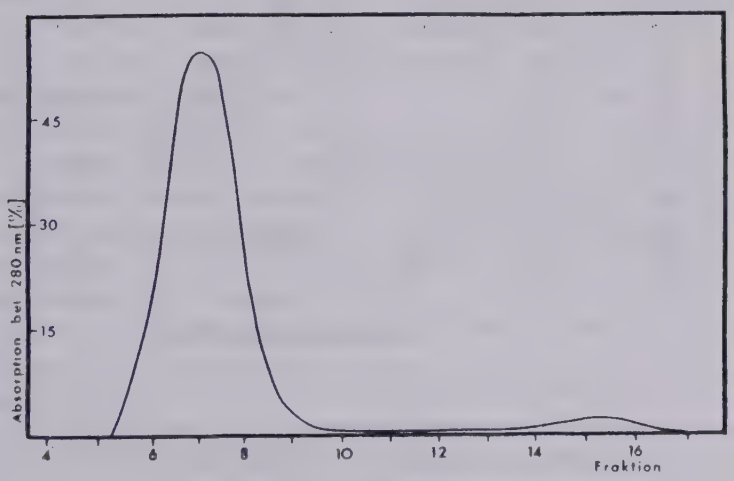


Abb.10 Gelchromatographie von (RSA + ß-OH-DS)

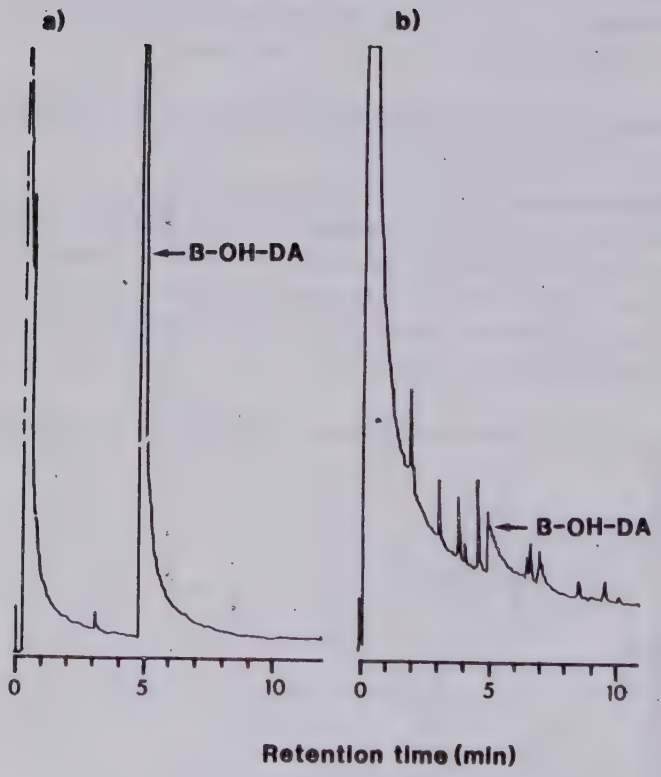


Abb.11 Gaschromatographie von ß-OH-DS und (RSA+ß-OH-DS)
a) Kontrolle mit ß-OH-DS
b) (RSA + ß-OH-DS)

wurde eine Dünnschichtchromatographie angefertigt (Laufmittel Butanol, Äthanol, Eisessig, H_2O wie 8 : 2 : 1 : 3). Die Dünnschichtchromatographie der Fraktionen 6, 7 und 8, in denen auch der Albuminpeak lag (Abb.10), zeigte mit 2'7'-Dichlorfluorescein-Aluminiumchlorid-Eisen-III-chlorid Sprühlösung (Reagenz Nr.83, spezifischer Nachweis freier Fettsäuren, der Firma Merck, Darmstadt) keine freie ß-OH-DS. Daran anschließend wurden die Fraktionen 6, 7 und 8 lyophilisiert.

Um eine Bindung der Fettsäure an das Protein nachzuweisen, wurde das gepoolte lyophilisierte Protein mit BF_3/Methanol-Komplex (Firma Merck) nach Morrison (31) zersetzt, wobei gleichzeitig eventuell gebundene Fettsäure mit Methyl verestert wird. Der flüchtige Fettsäureester kann anschliessend mit einer Gaschromatographie nachgewiesen werden. Im einzelnen wurde wie folgt vorgegangen: je zwei Spatelspitzen der lyophilisierten Substanz von Fraktion 6, 7 und 8, und zur Kontrolle eine halbe Spatelspitze ß-OH-DS, wurden in je 2 ml BF_3/Methanol gelöst und für eine Stunde auf 60°C erwärmt (druckgesicherte Reagenzgläser). Nach Abkühlen wurden je 4 ml Petroläther 40°C - 60°C und 2 ml H_2O zugegeben und dann bei 3000xg für zehn Minuten zentrifugiert. Es bilden sich zwei Phasen, Zerfallsprodukte des Proteins und der Fettsäureester befinden sich in der Petrolätherphase. Der Überstand (Petrolätherphase) wurde abpipettiert, diesselbe Extraktion zweimal wiederholt und abschließend die Petrolätherphase aller Extraktionen einer Probe durch Einblasen von N_2 auf 0,5 ml eingeengt. Die Gaschromatographie der Proben zeigt die Abb.11 (Varian GC-Gerät 3700, Varian GmbH, Darmstadt, für Glaskapillarsäulen; 25 m Dünnfilm-Glassäule belegt mit OV 17, Trägergas Stickstoff, Flammenionisationsdetektor, Papiergeschwindigkeit 0,5 cm/min). Die Abb.11 a) zeigt die Kontrolle mit ß-OH-DS, die Abb.11 b) das Beispiel einer Probe der lyophilisierten Proteinfraktionen; man sieht die übereinstimmende Form und Retentionszeit von 4,8 Minuten. Da eine Kontrolle mit ebenso behandeltem RSA ohne ß-OH-DS keinen vergleichbaren Peak aufwies, kann von einer

stattgefundenen Koppelung von ß-OH-DS an RSA ausgegangen werden. Der oben angegebene Nachweis wurde einmal wiederholt.

4.Antikörpernachweis

4.1 Ouchterlony-Agardiffusionstest

Der Test war sowohl für GL, wie auch für ß-OH-DS, bei den verschiedenen Konzentrationen (siehe II.8.1.) und für die Seren K_1 bis K_6 (Serum von Kaninchen 1 bis Serum von Kaninchen 6, siehe II.7.) bei Ablesezeiten von 24, 48,..., 144 Stunden negativ. Bei der Verwendung von 'auxilary lipid' (Lecithin) zeigte sich bei K_2, K_3, K_4 unter sonst gleichen Bedingungen eine nicht näher bestimmbare Schleierbildung, die bei den Seren K_1, K_5, K_6 nicht auftrat. Insgesamt muß der Testausgang jedoch auch hier als negativ angesehen werden. Anzumerken ist, daß eine Anwendung des Agardiffusionstestes zum Nachweis von Antikörpern gegen Lipide Schwierigkeiten bereitet (u.a.30,14).

4.2 Hämolysehemmtests mit Glykolipid (GL)

Diesem und den folgenden Tests zu Grunde liegt die Idee, daß die hämolytische Wirkung von GL durch 'Bindung' an Antikörper gegen GL u.U. eingeschränkt bzw. aufgehoben werden könnte. Ein Nachweis von Antikörpern wäre gegeben, wenn unspezifisches Kaninchenserum diese hämolysehemmende Wirkung nicht hätte und die hämolysehemmende Wirkung eines spezifischen Serums auf dessen Ig-Fraktion einschränkbar wäre.

Zur Herstellung einer GL-Verdünnungsreihe wurden 45 mg pro ml GL in Veronalpuffer pH 7,2 mit NaOH auf pH 7,2 eingestellt und gelöst, anschließend wurde mit weiterem Veronalpuffer pH 7,2 eine 1 : 2 Verdünnungsreihe so angefertigt, daß beim GL-Titer 1 : 1 0,9 mg GL in 40 µl der Verdünnung vorlagen.

Hämolyse der GL-Verdünnungsreihe:

GL	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
	⊕	⊕	⊕	⊕	O	O	O	O

100% Hämolyse (1 Stunde, 37°C) ja ⊕ - nein O, Hammel-

erythrozyten 20 µl (10%-ige Suspension in Veronalpuffer pH 7,2), je 40 µl einer entsprechenden GL-Verdünnung, 85 µl Veronalpuffer pH 7,2 ergänzend auf 145 µl Gesamtflüssigkeit pro Näpfchen

4.2.1 Hemmtest mit frischem Serum

GL	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	Kontrolle A	Kontrolle B
K_1	⊕	⊕	⊕	⊕	O	O	O	O	O	O
K_2	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	O	O
K_3	⊕	⊕	O	O	O	O	O	O	O	O
K_4	⊕	O	O	O	O	O	O	O	O	O
K_5	⊕	O	O	O	O	O	O	O	O	O
K_6	⊕	O	O	O	O	O	O	O	O	O
K_u	⊕	O	O	O	O	O	O	O	O	O

K_1 bis K_6: Serum K_1 bis K_6, K_u: unspezifisches Kaninchenserum, Serum 60 µl pro Näpfchen, Hammelerythrozyten 20 µl (10%-ige Suspension in Veronalpuffer pH 7,2) pro Näpfchen, 40 µl einer entsprechenden GL-Verdünnung (4.2) pro Näpfchen, 25 µl Veronalpuffer pH 7,2 ergänzend auf 145 µl Gesamtflüssigkeit pro Näpfchen, Kontrolle A ohne GL (dafür 40 µl Veronalpuffer pH 7,2), Kontrolle B ohne GL aber mit RSA $2 \cdot 10^{-3}$ g gelöst in 40 µl Veronalpuffer pH 7,2 pro Näpfchen, 100% Hämolyse (1 Stunde, 37°C) ja ⊕ - nein O

4.2.2 Hemmtest mit komplementinaktiviertem Serum

GL	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
K_1	⊕	O	O	O	O	O	O	O
K_2	⊕	O	O	O	O	O	O	O
K_3	⊕	O	O	O	O	O	O	O
K_4	⊕	O	O	O	O	O	O	O
K_5	⊕	O	O	O	O	O	O	O
K_6	⊕	O	O	O	O	O	O	O
K_u	⊕	O	O	O	O	O	O	O
A	⊕	O	O	O	O	O	O	O

K_1 bis K_6, K_u: 60 µl komplementinaktiviertes Serum pro Näpfchen, A: statt Serum 60 µl Veronalpuffer pH 7,2 mit $3 \cdot 10^{-3}$ g RSA pro Näpfchen, sonstige Bedingungen wie in 4.2.1

Die Versuche in 4.2.1 und 4.2.2 zeigen, daß die Seren K_1 bis K_6 die hämolytische Wirkung von GL nicht stärker abzu-

schwächen vermögen, als unspezifisches Serum oder Rinderserumalbumin. Serum K_2 verstärkt die hämolytische Wirkung von GL; diese Wirkung ist von der Anwesenheit von GL (4.2.1 Kontrolle B) und Komplement abhängig (4.2.2). Die bei Serum K_1 und K_3 auftretende Hämolyse ist stärker als bei Verwendung von unspezifischem Serum, jedoch nicht stärker als bei Verwendung von GL alleine.

4.3 Hämolysetests mit Glykolipid (GL) und Zusatz von Komplement

4.3.1 Hämolysetest mit komplementinaktiviertem Serum und Zusatz von Komplement

Gearbeitet wurde mit einer von sich aus sicher nicht hämolysierenden GL-Verdünnung von 1 : 64. Von den Seren K_1 bis K_6 und unspezifischem Serum wurden 9-stufige 1 : 2 Verdünnungsreihen angefertigt. Pro Näpfchen wurden verwendet: 40 µl GL der Verdünnung 1 : 64, 20 µl einer 10%-igen Hammelerythrozytensuspension in Veronalpuffer pH 7,2, 60 µl einer entsprechenden komplementinaktivierten Serumverdünnung, 25 µl Meerschweinchen- oder Kaninchenkomplement (Behringwerke Marburg, lyophilisiert, gelöst in beiliegendem Lösungsmittel und weiterverdünnt mit Veronalpuffer pH 7,2 ca. 1 : 10, siehe II.8.2); die Gesamtflüssigkeit pro Näpfchen war 145 µl.

Serumverdünnung	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:1 GL=O
					GL 1:64				
K_2 mit Meerschweinchenkomplement	⊕	⊕	⊕	⊕	O	O	O	O	O
K_2 mit Kaninchenkomplement	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	O	O	O	O

Hämolyse 100% (1 Stunde, 37°C) ja ⊕ - nein O

Die Versuche mit den Seren K_1, K_3 bis K_6, unspezifischem Serum und einer Kontrolle mit 60 µl Veronalpuffer pH 7,2 statt Serum waren negativ, das heißt zeigten bei einer GL-Verdünnung von 1 : 64, 60 µl komplementinaktiviertem Serum einer entsprechenden Verdünnung bzw. 60 µl Veronalpuffer pH 7,2

statt Serum zur Kontrolle und Zusatz von 25 µl Meerschweinchen- oder Kaninchenkomplement keine Hämolyse. Die Kontrolle ohne GL (statt dessen 40 µl Veronalpuffer pH 7,2) war negativ.

4.3.2 Hämolysetest mit der salzgefällten Ig-Fraktion von Serum K_2

5 ml Serum K_2 wurden mit 2,5 ml gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt, bei 4°C zwei Stunden gerührt und 10 Minuten bei 2500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet in 5 ml Veronalpuffer pH 7,2 gelöst und anschließend für 48 Stunden gegen Veronalpuffer pH 7,2 dialysiert (41). Die so gewonnene rohe Serum-Immunglobulin-Fraktion enthält alle Immunglobuline. Mit dem Dialysat wurde, wie mit dem Serum in 4.3.1, eine 9-stufige 1 : 2 Verdünnungsreihe angefertigt und der vorangegangene Test wiederholt.

Verdünnung der Ig-Fraktion

	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:1 GL=O
	⌜	———	———	———	GL 1:64	———	———	⌝	
K_2 mit Meerschweinchenkomplement	⊕	⊕	⊕	⊕	O	O	O	O	O
K_2 mit Kaninchenkomplement	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	O	O	O	O

Hämolyse 100% (1 Stunde, 37°C) ja ⊕ - nein O, 60 µl einer entsprechenden Verdünnung der Serum-Ig-Fraktion, sonstige Bedingungen wie in 4.3.1.

4.3.3 Hämolysetest mit der isolierten Ig G-Fraktion von Serum K_2

8 ml Serum K_2 wurden an Protein A Sepharose (Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg) mit einer Säule von Länge 4 cm, Durchmesser 1,5 cm, Laufmittel 0,1 M PBS pH 7,4 gelchromatographiert (Uvicord S, Microperpex Peristaltic Pump, Multirac 2111 von LKB Instrumente GmbH). Nach Durchlauf aller Proteinfraktionen wurde Ig G mit Glycin/HCl-Puffer pH 2,8 eluiert (100 Tropfen pro Auffangglas, 1 ml 0,1 M Trispuffer pH 10 pro Glas vorgelegt, um eine Zerstörung von Ig G durch das saure Milieu zu verhindern). Die Ig G Fraktion, durch

Puffer und Laufmittel insgesamt ca. 25 ml, wurde auf pH 7,4 eingestellt und gegen 0,1 M PBS pH 7,4 für 24 Stunden dialysiert. Wie in 4.3.2 wurde anschließend mit Ammoniumsulfat Ig G gefällt, das Pellet in 8 ml Veronalpuffer pH 7,2 gelöst und für 48 Stunden gegen Veronalpuffer pH 7,2 dialysiert. Von dem Dialysat wurde wieder eine 1 : 2 Verdünnungsreihe angefertigt. Pro Näpfchen wurden verwendet: 40 µl GL-Verdünnung 1 : 64 (nicht hämolytisch), 20 µl einer 10%-igen Hammelerythrozytensuspension in Veronalpuffer pH 7,2, 60 µl einer entsprechenden Ig G-Verdünnung, 25 µl Kaninchen- oder Meerschweinchenkomplement (s.o.); die Gesamtflüssigkeit pro Näpfchen war wieder 145 µl.

Verdünnung der Ig G-Fraktion

	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
	⌜				GL 1:64			⌝
K_2	⊕	⊕	O	O	O	O	O	O
	mit Meerschweinchenkomplement							
K_2	⊕	⊕	⊕	O	O	O	O	O
	mit Kaninchenkomplement							

4.3.4 Hämolysetest mit der Ig-Fraktion ohne Ig G von Serum K_2

Aus dem Proteindurchlauf der Gelchromatographie von 4.3.3, der kein Ig G enthält, wurde die verbliebene Ig-Fraktion durch Ammoniumsulfatfällung (s.4.3.2) gewonnen. Mit den 8 ml des Dialysats wurde eine 1 : 2 Verdünnungsreihe angefertigt und wieder wurden 60 µl einer entsprechenden Verdünnung pro Näpfchen verwendet. Die sonstigen Bedingungen wurden wie in den vorangegangenen Tests gewählt.

Verdünnung der Ig-Fraktion ohne Ig G

	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
	⌜				GL 1:64			⌝
K_2	⊕	⊕	⊕	O	O	O	O	O
	mit Meerschweinchenkomplement							
K_2	⊕	⊕	⊕	O	O	O	O	O
	mit Kaninchenkomplement							

4.4 Hämolysehemmtests und Hämolysetests mit ß-OH-Dekansäure (ß-OH-DS)

Die in 4.2 und 4.3 mit GL ausgeführten Tests wurden in analoger Weise mit den Seren K_1 bis K_6 und ß-OH-DS durchgeführt. Die Ergebnisse waren negativ, das heißt zwischen den Seren K_1 bis K_6 und unspezifischem Serum war kein Unterschied bezüglich der hämolysierenden Wirkung von ß-OH-DS festzustellen.

4.5 Zusammenstellung und Interpretation der Ergebnisse von 4.2 bis 4.4

Die Hemmung der durch GL verursachten Lyse von Hammelerythrozyten durch die Seren K_1 bis K_6 ist nicht größer als die von unspezifischem Kaninchenserum (4.2.1, 4.2.2). Diese durch unspezifisches Serum und durch die komplementinaktivierten Seren K_1 bis K_6 erfolgende Hämolysehemmung kann durch eine unspezifische 'Bindung' an Eiweiß, z.B. Albumin erklärt werden (4.2.2). Serum K_2 verstärkt die hämolytische Wirkung von GL (4.2.1). Die die Hämolyse steigernde Wirkung von Serum K_2 ist keine Eigenschaft des Se-

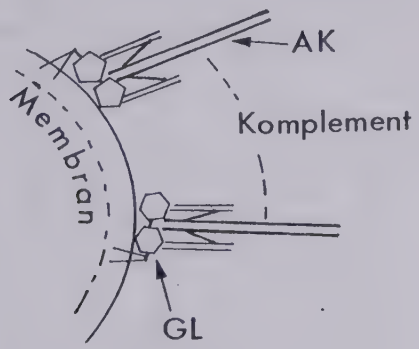


Abb.12 Erklärungsmodell für die die Hämolyse verstärkende Wirkung von Antikörpern gegen GL

Kaninchen		Reziproker Titer der GL induzierten Hämolyse bei Zugabe von Serum		Reziproker Titer der GL induzierten Hämolyse bei Zusatz von Komplement (Kaninchen) und Zugabe von			
Nr.	immunisiert mit	frisch	Komplement-inaktiviert	Serum	Gesamt-Ig	Ig G	Gesamt-Ig ohne Ig G
1	GL-Liposomen	8	1	0	0	0	0
2		128	1	16	16	4	4
3	GL	2	1	0	0	0	0
4		1	1	0	0	0	0
5	ß-OH-DS + RSA	1	1	0	0	0	0
6	ß-OH-DS	1	1	0	0	0	0
un-spez.	—	1	1	0	0	0	0
Testnummer		4.2.1	4.2.2	4.3.1	4.3.2	4.3.3	4.3.4

Tabelle 1 Zusammenfassung der Ergebnisse von 4.2.1 bis 4.3.4

rums sui generis, - sie ist von der Anwesenheit von GL und von Komplement abhängig (4.2.2, 4.3.1, Kontrollen). Die von Komplement und GL abhängige, die Hämolyse steigernde Wirkung von Serum K_2 ist auf dessen Ig-Fraktion einschränkbar (4.3.2, keine Lyse durch den Überstand der Fällung). Daraus folgt, daß in Serum K_2 Antikörper gegen GL angenommen werden dürfen, die durch eine Antigen - Antikörper - Reaktion induzierte Komplementaktivierung die hämolytische Wirkung von GL verstärken (siehe Tabelle 1). 4.3.3 und 4.3.4 zeigen, daß die Antikörper gegen GL im Serum K_2 zu einem Teil der Ig G-Fraktion, zum anderen Teil der Rest-Ig-Fraktion angehören. 4.4 legt nahe, daß diese Antikörper den Zuckeranteil oder die Elektronenkonfiguration an der Bindungsstelle von Fettsäure- und Zuckeranteil des GL-Moleküls erkennen, und zeigt, daß ß-OH-DS mit den angewandten Methoden nicht immunogen war. Ein Erklärungsmodell bietet die Vorstellung, daß durch die 'Bindung' von Antikörpern an das an der Erythrozytenmembran haftende GL Komplement in Membrannähe aktiviert wird (Abb.12). Anders ausgedrückt heißt dies: werden Antikörper gegen GL gebildet, besteht die Möglichkeit, daß dadurch die hämolytische Wirkung von GL verstärkt wird, kurz, eine Antikörperbildung gegen GL kann die pathogene Wirkung von GL verstärken.

IV. Diskussion

Die annähernde Gleichheit der hämolytischen Potenz von GL und ß-OH-DS legt nahe, die amphiphile Struktur des GL für dessen hämolytische Wirkung verantwortlich zu machen. Als Erklärungsmodell kann dabei die Annahme einer Wechselwirkung zwischen den apolaren Teilen des GL und der Zellmembran dienen, - bei welcher die Fettsäuren mit ihrem hydrophoben C-Kettenanteil in die ebenfalls hydrophobe äußere Lipidschicht der Zellmembran eindringen und diese zumindest partiell zerstören (Abb.13). Der exakte Mechanismus der Hämolyse ist auch für ähnliche Substanzen nicht bekannt (44).

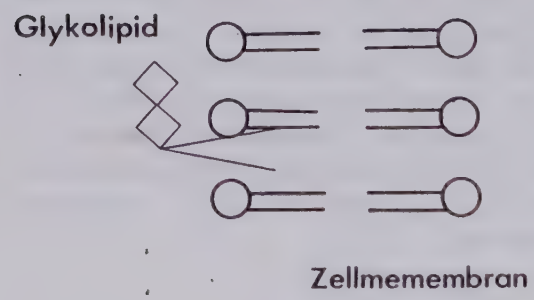


Abb.13 Erklärungsmodell für die hämolytische Wirkung von GL

Die hämolytische bzw. toxische Wirkung von GL ist gering (siehe I.). Überschlägt man aus den in III.1.3 angegebenen Konzentrationen die für die Hämolyse eines Erythrozyten notwendige Anzahl von GL-Molekülen, ergibt sich, daß bei noch nicht lytischen Konzentrationen von GL die Zellmembran mit einer Zahl von mehr als 10^4 GL-Molekülen besetzt sein kann. Die hohe unspezifische Adhärenz von GL an die verschiedensten Oberflächen kann durch die amphiphile Struktur erklärt werden. Der Mechanismus der PA-Adhärenz

ist unklar (2), eine Beteiligung von GL scheint aus den oben genannten Gründen denkbar. Mögliche Gegenpunkte ergeben sich aus der Beobachtung, daß GL in der stationären Phase des PA-Wachstums in höheren Konzentrationen gebildet wird als zuvor, daß die Anwesenheit von Phosphat die GL-Bildung durch PA verringert (23) und daß bestimmte PA - Stämme kein GL bilden. Letzteres ließe sich für Untersuchungen in dieser Richtung, die durch den Vergleich oder die Kontrolle mit synthetisierter ß-OH-DS vereinfacht werden könnten, verwenden.

Wesentliches Ergebnis der Immunisierungsversuche mit GL und ß-OH-DS war, über den Nachweis der Möglichkeit des Einbaus von GL in Liposomen bzw. der Koppelung von ß-OH-DS an RSA mit der Carbodiimidmethode hinaus, daß in Liposomen inkorporiertes GL immunogen sein kann. Die Versuche bestätigen andere Untersuchungen, die die geringe bzw. fehlende Immunogenität von Glykolipiden (und dabei die Immunogenität der Zucker) bzw. von Fettsäuren zeigten. Werden Antikörper gegen GL gebildet, besteht die Möglichkeit, daß diese die pathogene Wirkung von GL durch eine Komplementaktivierung verstärken. In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, daß dies nur in vitro gezeigt wurde und die Zahl der Versuchstiere gering war. Als praktische Konsequenz wäre bei Lungeninfektionen durch PA (oder auch anderen Keimen) an eine Erprobung von Aerosolen mit amphoterer Struktur zu denken, die die physiologische Funktion des Surfactants unterstützen und auf Grund ihrer Struktur Toxine mit Lipidcharakter unspezifisch neutralisieren.

Auf Grund der klinischen Erfahrung, daß PA z.B. bei Cystischer Fibrose eine pathogene Primärbesiedlung mit Streptokokken und Staphylokokken verdrängen kann, wurde stichprobenhaft die Wirkung von ß-OH-DS auf diese Keime getestet. Die, wenn auch nicht sehr starke, bakteriostatische Wirkung von ß-OH-DS läßt vermuten, daß ß-OH-DS auch für die entsprechenden Wirkungen von pyolipic acid verantwortlich ist. Ein nächster Schritt wäre die Erprobung der Wirkung von ß-OH-DS (und GL und pyolipic acid) auf ein breites Spektrum von Bakterien

und eine Quantifizierung der Rolle von GL bzw. pyolipic acid bei der Verdrängung anderer pathogener Bakterien.

V. Zusammenfassung

Für die Pathogenität von Pseudomonas aeruginosa werden dessen verschiedene Enzyme und Exotoxine verantwortlich gemacht. Glykolipid (GL), eines dieser Exotoxine, das hämolytische Eigenschaften besitzt, ist immunologisch ein Hapten. Mit in künstliche Liposomen inkorporiertem GL einerseits, und mit einer reinen Emulsion von GL und CFA andererseits, wurde versucht, eine Antikörperbildung gegen GL im Tierexperiment (Kaninchen) zu erzielen. Diese Versuche waren mit in Liposomen inkorporiertem GL in einem Fall erfolgreich. Dabei zeigte sich, daß gegen GL gebildete Antikörper in Anwesenheit von Komplement die pathogene Wirkung von GL verstärken können (gezeigt in vitro). Ein Erklärungsmodell für diesen Vorgang bietet die Vorstellung, daß die hydrophoben C-Kettenanteile des GL in die äußere Membranschicht von Erythrozyten eindringen, Antikörper gegen GL den Zuckeranteil oder entsprechende Bindungsstellen des GL erkennen, - und eine hierdurch stattfindende Komplementaktivierung die Hämolyse durch das GL verstärkt.

ß-OH-Dekansäure (ß-OH-DS) ist Teilmolekül von GL und Bestandteil weiterer Sekundärmetaboliten von Pseudomonas aeruginosa, die teilweise antibakterielle Eigenschaften, Detergenscharakter etc. besitzen. Ein von Frankenfeld für die Reformatsky-Synthese von ß-OH-Fettsäuren niedrigerer C-Atomzahl angegebenes Verfahren wurde auf die entsprechenden Verhältnisse übertragen, und gezeigt, daß damit auch ß-OH-DS in größeren Mengen gewonnen werden kann. Weiter wurde gezeigt, daß ß-OH-DS bakteriostatische Eigenschaften bezüglich Streptokokken und Staphylokokken besitzt und auch für die hämolytische Wirkung von GL verantwortlich ist. Eine Antikörperbildung gegen ß-OH-DS im Tierexperiment (Kaninchen) konnte weder durch die Koppelung an ein Trägerprotein (RSA) mit der Carbodiimidmethode, noch mit einer Emulsion von ß-OH-DS in CFA erreicht werden.

VI. Literaturverzeichnis

1 Beachey,E.H.; Binding of group A streptococci to human oral mucosal cells by lipoteichoic acid, Trans. Assoc.Am.Physicians, 88:285-292,1975

2 Beachey,E.H.; Bacterial adherence, Chapman and Hall, London, Metuen, New York, 1980

3 Beachey,E.H.; Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces, J.Infect.Diseases 143:325-345, 1981

4 Bergström,S., Theorell,H., Davide,H.; On a metabolic product of pseudomonas pyocyanea. Pyolipic acid, active against mycobacterium tuberculosis, Ark.Kemi. Mineral.Geol. 23A:1-12, 1948

5 Bullock,W., Hunter,W.; Über Pyocyanolysin, eine hämolytische Substanz in Culturen des Bacterium pyocyaneum, Zentralbl.Bakteriol.Parasit. 28:865-976, 1900

6 Butler,V.P., Beisser,S.M.; Antibodies to small molecules, Advanc.Immunol. 17:255-310, 1973

7 Chiu,T.H., Emdur,L.I., Platt,D.; Lipoteichoic acids from streptococcus sanguis, J.Bacteriol. 118(2):471-479, 1974

8 Czlonkowska,A., Leibowitz,S.; The effect of homologous and heterologous carriers on the immunogenicity of the galactocerebrosid hapten, Immunology 74: 1117-1126, 1974

9 Edwards,J.R., Hayashi,J.A.; Structure of rhamnolipid from pseudomonas aeruginosa, Arch.Biochem.Biophys. 111: 415-421, 1965

10 Finland,M.; Changing ecology of bacterial infections as related to antibiotic therapy, J.Infect.Diseases 122:419-431, 1970

11 Frankenfeld,J.W., Werner,J.J.; Improved procedure for the reformatsky-reaction of aliphatic aldehydes and ethyl-bromoacetate, J.Organic.Chem. 34:3689-3691, 1969

12 Gibbons,R.A.; Adherence of bacteria to host tissue, in Schlesinger (ed.) Microbiology, Am.Soc.Microbiol., Washington DC, S.395-406, 1977

13 Hakumori,S.; Preparation of antisera against glycolipids, Methods Enzymol. 28:232-236, 1972

14 Hamers,M.N., Donker-Koopman,W.E., Reijngoud,D., Schram, A.W., Tager,J.M.; An optical method for the detection and quantitation of antibodies to glycosphingolipids and other antigens, Immunochem. 15: 97-105, 1978

15 Hauser,G., Karnovsky,M.L.; Studies on the production of glycolipid by pseudomonas aeruginosa, J.Bacteriol. 68:645-654, 1954

16 Hisatsuka,K., Nakahara,T., Sano,N., Yamada,K.; Formation of rhamnolipid by pseudomonas aeruginosa, Agricol. Biol.Chem. 35:686-692, 1971

17 Houben-Weyl; Methoden der Organischen Chemie, Sauerstoffverbindungen III, Georg Thieme Verl. Stuttgart, 1966, S.421 ff

18 Hubbard,D.A., Lee,W.Y., Sehon,A.H.; Suppression of the anti-DNP Ig E response with tolerogenic conjugates of DNP with polyvinyl alcohol, J.Immunol. 126: 407-418, 1981

19 Isselbacher,K.J., Adams,R.D., Braunwald,E., Petersdorf, R.G., Wilson,J.D.; Harrison's principles of internal medicine, Mc Graw Hill Kogakusha LTD., 9. Aufl., 1980, S.1233 ff

20 Itoh,S., Hond,H., Tomita,T., Suzuki,T.; Rhamnolipids produced by pseudomonas aeruginosa grown on n-paraffin, J.Antibiot. 24:855-859, 1971

21 Itoh,S., Suzuki,T.; Effect of rhamnolipids on growth of pseudomonas aeruginosa mutant deficient in n-paraffin-utilizing ability, Agricol.Biol.Chem. 36: 2233-2235, 1972

22 Jarvis,F.G., Johnson,M.J.; A glycolipid produced by pseudomonas aeruginosa, J.Am.Chem.Soc. 71:4124-4126, 1949

23 Johnson,M.K., Boese-Marazzo,D.; Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from pseudomonas aeruginosa, Infection and Immunity 29:1028-1033, 1980

24 Katz,D.H.; Carrier function in anti-hapten antibody responses, J.Immunol. 110:107-117, 1973

25 Kiefer,H.; The chemical modifications of proteins, haptens and solid supports, Immunological methods 137-150, 1979

26 Kontianen,S.; Effect of number of haptens per carrier molecule on the anti-hapten response, Int.Arch. Allergy 41:729-738, 1971

27 Kurioka,S., Liu,P.V.; Effect of the hemolysin of pseudomonas aeruginosa on phosphatides and phospholipase C activity, J.Bacteriol. 93:670-674, 1967

28 Leisinger,T., Magraff,R.; Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads, Microbiol.Reviews 43: 422-442, 1979

29 Liu,P.V.; Extracellular toxins of pseudomonas aeruginosa, J.Infect.Diseases 130: supplement 96, 1974

30 Marcus,D.M., Schwarting,G.A.; Immunochemical properties of glycolipids and phospholipids, Advanc.Immunol. 23:203-241, 1976

31 Morrison,W.R., Smith,L.M.; Preparation of fatty acid methylesters and dimethylacetals from lipids with brom fluoride-methanol, J.Lipid Research 5:600-608, 1964

32 Nagase,F., Nakashima,I., Kato,N.; Studies on the immune-response in chicken III., Immunology 37:339-344, 1979

33 Pretsch,E., Clerc,J.T., Seibl,J.; Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen, Springer Verl. Berlin, Heidelberg, New York, 1981, Bd.XV

34 Rapport,M.M.; Immunochemical properties of lipids, J.Lipid Research 1:25-28, 1961

35 Rapport,M.M., Graf,L.; Immunochemical reactions of lipids, Prog.Allergy 13:273-291, 1969

36 Rietschel,E.T.; Absolute configuration of 3-hydroxy fatty-acids present in lipopolysaccharids from various bacterial groups, Europ.J.Biochem. 64:423-428, 1976

37 Sabath,L.; Pseudomonas aeruginosa, Hans Huber Publishers, 1.Aufl., 1980, S.9 ff

38 Sephadex und Sepharose Informationsschrift der Firma Deutsche Pharmacia GmbH, Freiburg bzw. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden, 1980

39 Sheehan,J.C.; 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid, Am.Soc. 87:2492-2498, 1965

40 Skogh,S.; Higher normal chain DL-ß-hydroxy acids, Acta Chem.Scand. 6:806-817, 1952

41 Weir; Handbook of Immunology, Blackwell Scientific Publications, 3.Aufl., 1978

42 Weissmann,G., Sessa,G., Weissmann,S.; Effect of steroids and triton X-100 on glucose filled phospholipid/cholesterol structures, Nature 208:649-651, 1965

43 Weissmann,G.; Liposomal model membranes, Biochem.Pharmacol. 15:1537-1542, 1966

44 Weltzien,H.U.; Cytolytic and membran-pertubing properties of lysophosphatidylcholin, Biochem.Biophys. Acta 559:259-287, 1979

45 WickenA.J., Knox,K.W.; Lipoteichoic acids. A new class of bacterial antigens, Science (Engl.) 187:1161-1167, 1975

46 Williams,C.A., Chase,M.W.; Methods in immunology and immunochemistry, Academic Press, New York, 1967, Bd.I, S.154 ff

47 Wood,C., Kabat,E.A.; Immunochemical studies of conjugates of isomaltosyl-oligosaccharides, J.Exp.Med. 154:432-449, 1981

48 Wünsch,K.; Schutzgruppe Benzyläther, Chem.Berichte 97: 2497-2501, 1964

49 Yamaguchi,M., Sato,S., Yukuyama,A.; Microbial production of sugarlipids, Chem.Ind. 741-742, 1976

50 Yamashita,T.; Induction of antihapten antibody response by hapten - isologous carrier conjugate I., Cell. Immunol. 14:182-192, 1974

51 Yasuda,T., Dancey,G.F., Kinsky,S.C.; Immunogenicity of liposomal model membranes in mice, Proc.Natl. Acad.Sci. USA 74:1234-1236, 1977

Lebenslauf

Am 15. 06. 1952 wurde ich, Werner Löffler, als Sohn des Friedrich Löffler und der Marianne Löffler, geb. Denzel, in Stuttgart geboren. Von 1959 bis 1963 besuchte ich die Hauptschule, von 1963 bis zu meinem Abitur 1971 das Hegel-Gymnasium in Stuttgart-Vaihingen. Nach der Dienstzeit bei der Bundeswehr begann ich im Herbst 1973 an der Universität Tübingen mit dem Studium der Mathematik und Volkswirtschaft. Im Herbst 1975 legte ich in beiden Fächern das Vordiplom ab. 1976 erhielt ich für diese Fächer ein Stipendium von der französischen Regierung an der Universität Toulouse.
Eine Sportverletzung im Sommer 1976, nach der ich durch einen chirurgischen Eingriff eine Lähmung der Schultermuskulatur erlitt, führten mich zu einer näheren Auseinandersetzung mit dem Gebiet der Medizin. Im Frühjahr 1977 begann ich an der Universität Heidelberg mit dem Studium der Humanmedizin. Im März 1979 legte ich in Tübingen das Physikum, im März 1980 und März 1982, nach Famulaturen in Tansania und Ruanda, den ersten und den zweiten Abschnitt des medizinischen Staatsexamen ab. Vom Herbst 1979 bis zum erfolgreichen Abschluß des dritten Abschnittes des medizinischen Staatsexamens am 28. 10. 1983 erhielt ich ein Stipendium der Friedrich-Ebert-Stiftung.